

(19) Japanese Patent Office

(11) Patent Application Laid Open

(12) Published Unexamined Patent Application 4-13684(1992)

(51) Int.Cl. <sup>5</sup>	identification mark	reference number
C 07 G 1/100		8318-4H
A 61 K 31/715	ADU	9164-4C
C 07 G 3/00		8318-4H
C 08 B 37/00	Q	7624-4C
C 12 N 9/99		

(43) Laid Open January 17, 1992

no request for examination 2 claims (6 pages in total)

(54) Title of the Invention

Lignin glycoside and its use

(21) Application No. 2-113049(1990)

(22) Application Date April 28, 1990

(23) Inventor Seiti Tanuma

1-10 Omon-cho, Hachioji-si, Tokyo

(71) Applicant The Green Cross Corp.

1-3-3 Imabasi, Tyuou-ku, Osaka-si, Osaka

(74) Attorney Patent attorney Hajime Takashima

## SPECIFICATION

### 1. Title of the Invention

Lignin glycoside and its use

### 2. What is claimed is:

1. A lignin glycoside having the following properties.

(i) Lignin and polysaccharide are bonded.

(ii) The molecular weight is 8000 to 10000.

(iii) The bonding ratio of lignin and polysaccharide is 1:1 to 2:1 (molecular ratio).

(iv) Polysaccharide is composed of 10 to 20% of uronic acid, and 80 to 90% of neutral sugar.

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

2. A poly-(ADP-ribose) glycohydrolase inhibitor mainly composed of lignin glycoside.

### 3. Detailed Description of the Invention

#### [Industrial Field of Utilization]

The present invention relates to a novel lignin glycoside and its use.

#### [Prior Art - Problems to be Solved by the Invention]

Almost all existing anticancer drugs have the action of suppressing DNA synthesis or cell division, but these drugs present similar actions also to normal cells. By making use of a slight difference that the cancer cells are fast in cell division while normal cells are slow, treatment is conducted by giving more damages to cancer cells. Damages received by normal cells are expressed as side effects, and it is an important point in cancer treatment to what extent the body can withstand such side effects.

By nature, cancer treatment should be based on biology and biochemistry of cancer cells, but actually such cancer therapy is not realized yet.

As causes of cancer, traditionally, carcinogen, radiation and virus have been pointed out, and it has been clarified that cells are turned cancerous by the gene information of the cancer virus, and the term "oncogene" has been coined. It was later hypothesized that the oncogene is present also in normal cells and is switched on by some cause, to make the cells cancerous. As the hypothesis was discussed and proved, and is generally accepted nowadays.

In genomes of higher animals, there are 50 kinds or more proto-oncogenes that can be oncogenes, and they play important physiological functions in proliferation and differentiation of normal cells. Therefore it gives rise to possibility of control of cell proliferation or control of cancer at the level of genes or at the level of gene products. It is an object of the invention to develop a cancer remedy capable of suppressing the stage of expression of oncogene by a specific inhibitor.

Using mouse mammary tumor cells of which expression of inserted mouse mammary tumor virus (MMTV) is controlled by corticoid, it has been discovered that expression of MMTV gene is triggered by de-poly-ADP-ribose reaction in chromatin protein. That is, as poly-ADP-ribose is decomposed, the local change of chromatic structure is considered to be finally related to promotion of bonding and transfer of RNA polymerase to promoter [Journal of Biological Chemistry, 258: 15371 (1983)].

Accordingly, the present inventor expected that the oncogene would not be activated if decomposition of poly-ADP-ribose could be inhibited, and hence isolated and refined poly-(ADP-ribose) glycohydrolase which is an enzyme responsible for decomposition of ADP-ribose from the human placenta, and searched for compounds having an inhibitory action on this enzyme, and then discovered a potent inhibitory activity in certain natural compounds.

Further promoting the investigation, a novel compound usable as a pharmaceutical having an anticancer action based on poly-(ADP-ribose) glycohydrolase inhibition was discovered, and the invention was completed.

[Means of Solving the Problems]

That is, the invention is characterized by the following.

1. A lignin glycoside having the following properties.

(i) Lignin and polysaccharide are bonded.

(ii) The molecular weight is 8000 to 10000.

(iii) The bonding ratio of lignin and polysaccharide is 1:1 to 2:1 (molecular ratio).

(iv) Polysaccharide is composed of 10 to 20% of uronic acid, and 80 to 90% of neutral sugar.

2. A poly-(ADP-ribose) glycohydrolase inhibitor mainly composed of lignin glycoside.

The lignin glycoside of the invention is a bonded composition of lignin and sugar (polysaccharide). Lignin and sugar (polysaccharide) are bonded by ether bonding. The bonding ratio of lignin: constituent sugar is, for example, about 1 to 2: 1 by weight. The molecular ratio of lignin and

polysaccharide is, for example, about 1 to 2: 1.

The sugar component of lignin glycoside is composed of uronic acid and neutral sugar. The composition is, for example, about 10 to 20% of uronic acid, and 80 to 90% of neutral sugar.

The neutral sugar includes glucose, galactose, mannose and arabinose. The composition is, for example, about 25 to 30 mol % of glucose, 40 to 45 mol % of galactose, 20 to 25 mol % of mannose, and 5 to 10 mol % of arabinose.

These constituent sugars have a structure of saccharides on the whole, and form a polysaccharide.

The molecular weight of lignin glycoside is about 8000 to 10000, and the molecular weight of polysaccharide portion is about 2000 to 4000. The molecular weight of lignin portion is about  $4000 \pm 20000$ .

The lignin glycoside of the invention is composed of the following elements: for example, about 35 to 45 wt.% of C atom, 1 to 10 wt.% of H atom, and 50 to 55 wt.% of O atom.

The lignin glycoside of the invention is prepared in the following manner.

The starting material includes, for example, pinecone, tea (leaves), grass dogwood, trisaccharide root, and etc.

The material is treated in the solvent (for example, hot water, ethanol, acetone). The treating time is about 1 to 15 hours. The treated material is extracted in an alkaline solution (0.1 to 1N sodium hydroxide, ammonium, etc.). The extracted liquid is adjusted to pH 4 to 6, and an equivalent amount of ethanol is added, and the supernatant fraction is recovered. The supernatant fraction is refined by gel filtration, and the active portion is recovered.

Thus obtained lignin glycoside can be treated by dialysis, centrifugal separation, freeze-drying, etc.

The lignin glycoside of the invention has poly-(ADP-ribose) glycohydrolase inhibitory action, and presents poly-(ADP-ribose) glycohydrolase inhibitory activity to mammals including humans (human, horse, dog, mouse, guinea pig, rat, etc.), and is useful for treatment and prevention of

malignant tumor and viral infection as poly-(ADP-ribose) glycohydrolase inhibitor.

The lignin glycoside of the invention is administered either orally or parenterally.

The lignin glycoside is administered either alone or in a form of pharmaceutical preparation together with a pharmaceutically allowable carrier. The preparation is manufactured by a known method. The dosage forms include tablet, capsule, powder, suppository, injection, etc.

The lignin glycoside is administered, for example, by oral route, usually by about 0.1 to 100 mg/kg of body weight a day either once or in several divided portions, but the dose may be changed depending on the age, body weight and/or severity of the disease to be treated and reaction to treatment.

#### Toxicity test

The toxicity of the lignin glycoside of the invention in mice was investigated, and, by oral administration, the LD<sub>50</sub> value was 100 mg/kg or more, and the LD<sub>50</sub> value was extremely high, and this is a compound with a broad safety region.

#### [Embodiments]

##### Embodiment 1

The lignin glycoside was extracted in the following operation.

##### Example

##### Pinecone

↓

##### Extraction in hot water

The boiling time varies with the amount of pinecones

↓ or amount of water, but is usually 2 hours x 3 times.

##### Extraction in ethanol

Pinecones extracted in hot water are half dried, and immersed in ethanol, and let stand overnight at room

↓ temperature.

##### Extraction in acetone

Pinecones extracted in ethanol are half dried, and

immersed in acetone, and let stand overnight at room  
↓ temperature.

Extraction in 1N sodium hydroxide (or ammonia) solution

Pinecones extracted in acetone are dried by lamp, and extracted in 1N sodium hydroxide solution while stirring for 6 hours (or overnight). Acetic acid is added to this extracted solution, and the pH is returned to 5.0. The precipitate is removed by high speed centrifugal  
↓ operation.

Precipitation in ethanol

An equivalent amount of ethanol is added to the extracted solution, and let stand overnight in a cold room. The precipitate is removed by high speed centrifugal operation,

↓ and the supernatant is dialyzed in water.

Freeze-drying

The dialyzed solution is freeze-dried, and powder is  
↓ obtained.

Gel filtration

The freeze-dried powder is refined by Sepharose CL- 4B (the moving bed is 0.1 N NaOH). Active fractions are collected and dialyzed in water, and freeze-dried, and powder is obtained. This freeze-dried powder is dissolved in 10% ethanol, and is further refined by Toyopearl HW-40F (the moving bed is 10% ethanol). Active fractions are collected, dialyzed in water, and freeze-dried, and powder, is obtained.

Embodiment 2

To investigate the characteristic of the structure of sugar portion (glycone) and non-sugar portion (aglycone) of the lignin glycoside, the glycoside was separated into glycone and aglycone by methanolysis (decomposition into methanol and hydrochloric acid) or chlorite ( $\text{NaClO}_2$ ) method, and analyzed. The results are as follows.

## [Analysis of glycone]

Composition of sugar <sup>a)</sup>	(%)	(total wt.%)
Uronic acid	1.4	15.1
Neutral sugar	8.9	84.9

It is a feature that 5/6 of glycone is neutral sugar.

Composition of neutral sugar <sup>b)</sup>	(mol %)
Glucose	25.1
Galactose	43.1
Mannose	21.9
Arabinose	9.9
Fucose	0

Neutral sugar contains glucose, galactose, mannose, and arabinose, but does not contain fucose.

a) Uronic acid was determined by carbazole method, and neutral sugar by phenol sulfate method.

b) The composition of neutral sugar was analyzed by gas chromatography after transforming methyl glycoside produced by methanolysis into trimethyl.

## [Analysis of aglycone]

Molecular weight: 4000±2000 by Toyopearl HW-40F gel filtration method.

Analysis of infrared absorption (IR)

IR was measured by using KBr disk.

As a result, an absorption having a peak at  $3400\text{ cm}^{-1}$  was detected in a range of  $3500$  to  $3700\text{ cm}^{-1}$ . This absorption indicates the presence of phenolic hydroxyl group. The absorption around  $1600\text{ cm}^{-1}$  shows an aromatic double bond. Since there is no absorption of carbonyl group around  $1700\text{ cm}^{-1}$ , there is no ester bond as noted in tannin, and it is proved to be a compound polymerized by ether bond as observed in lignin.

Including the fingerprint region, the entire spectrum is extremely similar to that of lignin (alkali).



From the above results of IR spectrum, the aglycone of this glycoside is estimated to be a lignin-like compound, not tannin-like compound.

#### Analysis of ultraviolet absorption (UV)

Maximum absorption was detected at 280 nm, and minimum absorption at 260 nm.

$$280/260 = 1.02$$

Lignin also has a similar UV spectrum.

$$280/260 = 1.03$$

The presence of aromatic group (probably phenol) is indicated by UV spectrum.

#### Analysis of electron spin resonance (ESR)

Same as in lignin,  $g = 2.004$  ESR signal is detected, and it is known to contain a structure having a stable free radical. Such signal is not observed in tannin.

#### [Analysis of lignin glycoside]

The feature as the entire lignin glycoside is as follows.

Element analysis	(weight %)
C	40.38
H	4.85
O	54.74
N	0.03 or less
S	0

Since nitrogen and sulfur are not contained, it is free from protein and sulfate group, and the molecular weight by Sepharose CL-4B gel filtration method about 9000.

The bonding ratio of lignin and sugar is about 1.5: 1 by weight.

Therefore, it is a feature of this glycoside that it contains neutral sugar by about 85% of the total weight as sugar component (glycone). The neutral sugar includes glucose, galactose, mannose, and arabinose. The non-sugar component (aglycone) is composed of lignin.

This glycoside is an O-glycoside having the reduction end lactol hydroxyl group of sugar bonded in ether form with

alcoholic or phenolic hydroxyl group of lignin by dehydration and condensation. The bonding ratio of lignin and sugar is about 1.5:1 by weight, and in particular it is a lignin glycoside (as classified by the feature of aglycone) with molecular weight of about 9000 with a particularly large content of neutral sugars.

The estimated structural model of the glycoside is as shown in the diagram.

#### Test example 1

Inhibitory effect on poly-(ADP-ribose) glycohydrolase

To a buffer for assay (0.01% bovine serum albumin, 10 mM mercaptoethanol, 50 mM potassium phosphate, pH 7.0),  $^3\text{H}$ -(ADP-ribose)<sub>n=15</sub> was added, and to 27  $\mu\text{l}$  thereof, further, the substance to be tested and nuclear derivative poly-(ADP-ribose) glycohydrolase solution prepared from human placenta were added to make up 30  $\mu\text{l}$  in total, which was incubated for 1 hour at 37°C. Later, the reaction solution was absorbed in DE81 filter paper, and the filter paper was washed in water, ethanol and acetone, and was dried, and the unreacted substrate  $^3\text{H}$ -(ADP-ribose) was measured by liquid scintillation counter, and the inhibitory action of the test substance on this enzyme was investigated. Results are shown in Table 1, which shows all tested substances inhibited poly-(ADP-ribose) glycohydrolase dose-dependently.

Table 1

Inhibitory activity of lignin glycoside on poly-(ADP-ribose) glycohydrolase

Concentration of lignin glycoside ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )	Activity of poly-(ADP-ribose) glycohydrolase (%)
0	100
0.3	86
1.0	24
3.0	4

## Test example 2

## Inhibitory effect on gene expression

The gene expression system used in the test was 341 strains of mouse mammary tumor cells having mouse mammary tumor virus (MMTV) genes which are saccharide corticoid susceptible genes. The cell, in the presence of saccharide corticoid, expresses 35S RNA, and 24S RNA further undergoing splicing. This expression can be detected by using cDNA of the env portion. Herein, the test substance was added to 341 strains by 30  $\mu\text{g/ml}$ , and incubated for 30 minutes at 37°C, and dexamethazone was added to the system by  $10^{-7}\text{M}$ , and it was further incubated for 1 hour. Then, 341 cells were collected, high molecular RNA was extracted by guanidine-hydrochloric acid method, and after treating for 5 minutes at 60°C (20 mM MDPS, pH 7.0, 5 mM sodium acetate, 1 mM EDTA), electrophoresis was conducted (40 V, 16 h) by 1.2% agarose gel (same buffer). Consequently, transferring to nitrocellulose,  $^{32}\text{P}$ -MMTV-DNA (cDNA specific to env) was hybridized, and an autoradiogram was prepared by X-ray film. Using the autoradiogram, the concentration of 35S and 24S RNA bands was measured by densitometer, and the RNA expression amount was determined, and the result was compared with the control without addition of test substance, and the RNA expression inhibitory rate was calculated. As the result is shown in Table 2, the test substance presented the MMTV gene expression inhibitory action.

Table 2

Action of lignin glycoside on expression of mouse mammary tumor virus (MMTV) gene

	Dexamethazone ( $10^{-7}\text{M}$ )	Lignin glycoside (30 $\mu\text{g/ml}$ )	Sensitivity of 35S, 24S bands
1	+	+	++++
2	-	-	+
3	-	-	+
4	+	+	++

1: positive control, 2and3: negative control, 4: test group

## Test example 3

## Carcinostatic effect on mouse experimental tumor

In the abdominal cavity of mouse,  $1 \times 10^6$  tumor cells of sarcoma 180 were transplanted, and the test substance was continuously administered intraperitoneally for 1 to 4 days after transplantation. The antitumor activity was determined by the survival rate by comparison with the normal saline administration group.

The experiment was terminated on the 45th day after tumor transplantation. The results are shown in Table 3, and the test substance presented a carcinostatic action.

Table 3

Carcinostatic action of lignin glycoside on mouse tumor sarcoma 180

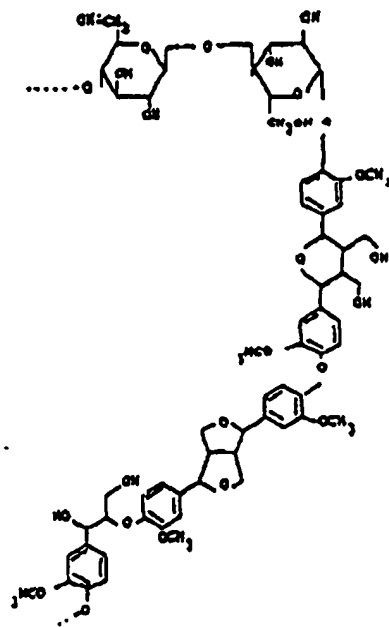
Sample	Dose	T/C
	(mg/kg)	(%)
None		100
Lignin glycoside	40×4	135
	20×4	177
	10×4	157
	5×4	122

The lignin glycoside was administered for 4 days consecutively from the day after transplantation.

The drawing shows the estimated structure of the lignin glycoside of the invention.

Applicant: The Green Cross Corp.

Attorney: Hajime Takashima, patent attorney



Procedure Amendment

November 20, 1990

To: Secretary-General, Patent Office of Japan

1. Indication of the case

Patent Application No. 113049 (1990)

2. Title of the invention

Lignin glycoside and its use

3. The amending party

Relation with the case: Applicant

Name: The Green Cross Corp.

4. Attorney

Address: Yuki Bldg., 3-3-9 Hiranomachi, Chuoku, Osaka  
541

Tel. 06-227-1156

Takashima International Patent Office

Name: Hajime Takashima, patent attorney (8079)

5. Date of amendment command

July 31, 1990 (mailing date)

6. Object of amendment

The line of "Brief description of the drawing" of the specification.

7. Content of amendment

(1) To replace page 19 of the specification with the attached sheet. (There is no change in the content except for the description of the amendment.)

The experiment was terminated on the 45th days after tumor tumor transplantation. The results are shown in Table 3, and the test substance presented a carcinostatic action.

Table 3

Carcinostatic action of lignin glycoside on mouse tumor sarcoma 180

Sample	Dose (mg/kg)	T/C (%)
None		100
Lignin glycoside	40×4	135
	20×4	177
	10×4	157
	5×4	122

The lignin glycoside was administered for 4 days consecutively from the day after transplantation.

#### 4. Brief Description of the Drawing

The drawing shows the estimated structure of the lignin glycoside of the invention.

Applicant: The Green Cross Corp.

Attorney: Hajime Takashima, patent attorney

⑩ 日本国特許庁(JP)

⑪ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報(A) 平4-13684

⑬ Int. Cl.<sup>3</sup>

識別記号

庁内整理番号

⑭ 公開 平成4年(1992)1月17日

C 07 G 1/00  
A 61 K 31/715  
C 07 G 3/00  
C 08 B 37/00  
C 12 N 9/99

ADU

Q

8318-4H  
9164-4C  
8318-4H  
7624-4C

審査請求 未請求 請求項の数 2 (全6頁)

⑯ 発明の名称 リグニン配糖体およびその用途

⑰ 特 願 平2-113049

⑱ 出 願 平2(1990)4月28日

⑲ 発 明 者 田 沼 靖 一 東京都八王子市小門町1-10

⑳ 出 願 人 株式会社ミドリ十字 大阪府大阪市中央区今橋1丁目3番3号

㉑ 代 理 人 弁理士 高 島 一

明 細 書

1. 発明の名称

リグニン配糖体およびその用途

2. 特許請求の範囲

(i) 以下の性質を有するリグニン配糖体。

(i) リグニンおよび多糖類が結合

(ii) 分子量は8000~10000

(iii) リグニンと多糖類の結合比は1:1~2:

1(分子比)

(iv) 多糖類はウロン酸10~20%、中性糖80~90%で構成されている。

(ii) リグニン配糖体を主成分とするポリ(ADP-リボース)グリコヒドロラーゼ阻害剤。

3. 発明の詳細な説明

(産業上の利用分野)

本発明は新規なリグニン配糖体およびその用途に関する。

(従来技術・発明が解決しようとする課題)

現有の抗癌剤の殆どは、DNA合成あるいは細胞分裂を抑制する作用を持つが、これは正常細胞

に対しても同等な作用を示す。わすかに癌細胞は細胞分裂が速く、正常細胞は遅いと言う差を利用して、癌細胞に、より多くの障害を与えることで治療が成り立っている。正常細胞が受けた障害は、副作用として表現され、生体はその副作用にどこまで耐えられるかが、癌治療上で重要なポイントとなっている。

以上の様に、本来の癌治療は癌細胞の生物学、生化学などに根ざすべきものであるが、現実にはその様な癌治療法にまで結びついていない。

さて、癌の原因と言うと免疫物質、放射線およびウイルスの3つが古くより言われてきた。その内、癌ウイルスの持つ遺伝情報により細胞が癌化することが明らかになり、oncogene(癌遺伝子)なる言葉が生まれた。その後、癌遺伝子は正常細胞にも存在し、それがある時スイッチオンされて、細胞が癌化するという仮説が立てられたのである。これは、時の流れと共に発展し、今日その大筋は正しかったことを誰しも認めるところである。

一方、高等動物のゲノムには癌遺伝子となり得



るproto-oncogeneは50種以上存在し、それらは正常細胞の増殖や分化に重要な生理機能を果たしている。それ故、細胞増殖や癌の制御の遺伝子のレベルもしくは遺伝子産物のレベルでのコントロールの可能性が生まれて来た。本発明は癌遺伝子発現の段階を、特異的阻害剤で抑制する癌治療剤を開発することにある。挿入されたマウス乳癌ウイルス(MMTV)遺伝子の発現がコレラコイドにより制御されているマウス乳癌細胞を用い、MMTV遺伝子発現にはクロマチンタンパク質での脱ポリADP-リボース反応が引金となっていることが見出されている。即ち、ポリADP-リボースが分解されることにより、その部分のクロマチン構造の局所変化が、最終的にはRNAポリメラーゼのプロモーターへの結合と転写促進につながると考えられている。(ジャーナル・バイオロジカル・ケミストリー、258:15371(1983))。

そこで、発明者はポリADP-リボースの分解を阻止すれば、癌遺伝子が活性化されなくなることが予想されたため、ADP-リボースの分解に

阻害剤との結合体である。リグニンと糖(多糖類)との結合はエーテル結合による。その結合比は、リグニン:構成糖の重量比で1~2:1程度が例示される。また、リグニンと多糖類との分子比で1~2:1程度が例示される。

リグニン配糖体の糖部分はウロン酸および中性糖より構成される。その組成としてはウロン酸10~20%、中性糖80~90%程度が例示される。

中性糖としては、グルコース、ガラクトース、マンノース、アラビノースが挙げられる。その組成としてはグルコース25~30mol%、ガラクトース40~45mol%、マンノース20~25mol%、アラビノース5~10mol%程度が例示される。

これらの構成糖は全体として糖鎖構造を取っており、多糖類を形成する。

リグニン配糖体の分子量は8000~10000程度であり、多糖類部分の分子量は2000~4000程度である。またリグニン部分は分子量4000±2000程度を有する。

関与する酵素であるポリ(ADP-リボース)グリコヒドラーゼをヒト胎盤より分離精製し、本酵素に対し阻害作用をもつ化合物を検討した結果、幾つかの天然化合物に強い阻害活性を見出した。

そして、さらに検討を助め、ポリ(ADP-リボース)グリコヒドラーゼ阻害に基づく抗癌作用を有する医薬品として使用に耐え得る新規化合物を見出し、本発明を完成した。

(課題を解決するための手段)

即ち、本発明は次の要旨を有するものである。

① 以下に示す性質を有するリグニン配糖体

(i) リグニンおよび多糖類が結合

(ii) 分子量は8000~10000

(iii) リグニンと多糖類の結合比は1:1~2:1(分子比)

(iv) 多糖類はウロン酸10~20%、中性糖80~90%で構成されている。

② リグニン配糖体を主成分とするポリ(ADP-リボース)グリコヒドラーゼ阻害剤。

本発明のリグニン配糖体は、リグニンと糖(多

糖)と結合したものである。本発明リグニン配糖体は、元素的にはC原子35~45重量%、H原子1~10重量%、O原子50~55重量%程度が例示される。

本発明のリグニン配糖体は以下のように調製される。

出発原料としては松かさ、茶(葉)、草みづき、三豆根等が挙げられる。

原料を各種溶媒(例えば、熱水、エタノール、アセトン等)で処理する。処理時間は1~15時間程度である。処理済み原料をアルカリ性溶液(0.1~1N水酸化ナトリウム、アンモニウム等)で抽出する。抽出液をpH4~6に調整し、等量のエタノールを添加して上清液を回収する。上清液をゲル濾過で精製して活性部分を回収する。

こうして得られたリグニン配糖体は透析、遠心分離、凍結乾燥等を実施することができる。

本発明のリグニン配糖体は、ポリ(ADP-リボース)グリコヒドラーゼ阻害作用を有し、ヒトを含む哺乳動物(ヒト、ウマ、イヌ、マウス、モルモット、ラット等)に対してポリ(ADP-

リボース)グリコヒドロラーゼ阻害活性を有し、ポリ(ADP-リボース)グリコヒドロラーゼ阻害剤として悪性腫瘍、ウイルス性感染症の治療、予防に有用なものである。

本発明のリグニン配糖体は、経口的または非経口的に投与される。

リグニン配糖体は、それ自体または製剤上許容されるキャリアとの医薬製剤の形で投与される。当該製剤は、目下既知の方法によって調製される。剤型としては、錠剤、カプセル剤、散剤、坐剤、注射剤等が例示される。

リグニン配糖体は、例えば、経口投与の場合、通常0.1~100mg/kg体重程度を1日1回または数回にわたって投与されるが、年齢、体重、および/または処置すべき病状の重症度や治療に対する反応によりその投与量は変わりうる。

#### 毒性実験

本発明のリグニン配糖体のマウスに対する毒性は、いずれも経口投与でLD<sub>50</sub>値が100mg/kg以上であり、投与量にくらべてLD<sub>50</sub>値が極めて

大きく、安全域の広い化合物である。

#### (実施例)

#### 実施例1

以下の処理に付すことによってリグニン配糖体を抽出した。

#### 例

#### 松かさ

#### 1 熱水抽出

煮沸時間は松かさの量、また水の量により異なるが通常2時間×3回行う。

#### 2 エタノール抽出

熱水抽出した松かさを半乾燥状態のままエタノールに浸し一昼夜室温に置く。

#### 3 アセトン抽出

エタノール抽出した松かさを半乾燥状態のままアセトンに浸し一昼夜室温に置く。

#### 4 1 N水酸化ナトリウム(又はアンモニア)溶液抽出

アセトン抽出した松かさをランプにて乾燥させ、1 N水酸化ナトリウム溶液にて6時間(又は一昼夜)浸漬しながら抽出する。この抽出後に酢酸を加えてpHを5.0に戻す。沈澱物は高速遠心により除去する。

#### 5 エタノール沈澱

抽出液に等量のエタノールを加え低温室に一昼夜置く。沈澱を高速遠心により除去し、上清を水に対して透析する。

#### 6 凍結乾燥

透析後の溶液を凍結乾燥にて粉末にする。

#### 7 ゲル濾過

凍結乾燥粉末をセファロース(Sephacel) CL-4Bにて精製する(移動層は0.1N NaOH)。

活性フラクションを蒸餾の水に対して透析した後、凍結乾燥より粉末にする。この凍結乾燥粉末を10%エタノール溶かし、トヨパールHW-40Fにてさらに精製する。(移動層は10%エタノール)。活性フラクションを蒸餾、水に対して透析した後、凍結乾燥により粉末にする。

#### 実施例2

リグニン配糖体の糖部分、グリコン(glycone)及び非糖部分、アグリコン(aglycone)の構造の特徴を検討するために、本配糖体をメタノリシス(メタノール-塩酸分解)、あるいは亜硫酸塩法(NaClO<sub>2</sub>)法によりグリコンとアグリコンに分離して分析を行った。その結果は次の通りである。

#### (グリコンの分析)

組成成分	(%)	(全重量%)
ウロン酸	1.4	15.1

中性糖 8.9 84.9

グリコンの5/6が中性糖であるという特徴を持つ。

中性糖の組成<sup>1)</sup> (mol %)

グルコース	25.1
ガラクトース	43.1
マンノース	21.9
アラビノース	9.9
フコース	0

中性糖としてはグルコース、ガラクトース、マンノース、アラビノースを含むが、フコースは含まない。

a) ウロン酸はカルバゾール法、中性糖はフェノール硫酸法で定量した。

b) 中性糖の組成はメタノリシスで生成するメチルグリコシドをトリメチル化した後ガスクロマトグラフィーで分析した。

(アグリコンの分析)

分子量: トロバールHW-40Fゲル濾過法により  $4000 \pm 200$

$$280/260 = 1.03$$

UVスペクトルにより芳香族(おそらくフェノール)の存在を示す。

電子スピン共鳴(ESR)分析

リグニンと同様に  $g = 2.004$  ESRシグナルが検出されることより安定なフリーラジカルを有する構造体を含むことを示す。なお、タンニンにはこの様なシグナルは見られない。

(リグニン配糖体の分析)

リグニン配糖体全体としての特徴

元素分析 (weight %)

C	40.38
H	4.85
O	54.74
N	0.03以下
S	0

窒素、硫黄を含有しないことより蛋白、硫酸基を含まずセファロース(Sephacrose) CL-4Bゲル濾過法による分子量は約9000である。

リグニンと糖の結合比は重量比で約1.5:1で

赤外吸収分析(IR)

IRはKBrディスクにより測定した。

その結果、 $3500 \sim 3700 \text{ cm}^{-1}$  範囲に  $3400 \text{ cm}^{-1}$  にピークをもつ吸収が検出された。この吸収はフェノール性水酸基の存在を示す。 $1600 \text{ cm}^{-1}$  付近の吸収は芳香族二重結合を示す。 $1700 \text{ cm}^{-1}$  付近にカルボニル基の吸収がないことよりタンニンに見られるようなエステル結合はなく、リグニンに見られるようなエーテル結合で重合している化合物であることを示す。

指紋領域も含めて全体のスペクトラムはリグニン(アルカリ)と極めて類似している。

以上のIRスペクトルの結果から本配糖体のアグリコンはタンニン様化合物ではなく、リグニン様化合物であると結論される。

紫外吸収(UV)分析

$280 \text{ nm}$  に最大吸収値、 $260 \text{ nm}$  に最小吸収値をもつ。

$$280/260 = 1.02$$

リグニンも同様のUVスペクトルをもつ

ある。

従って本配糖体は、糖部分(グリコン)として中性糖を全重量の約85%も含有するという特徴をもっている。中性糖としてはグルコース、ガラクトース、マンノース、アラビノースを含む。非糖部分(アグリコン)はリグニンより成るという特徴を有する。

本配糖体は糖の還元末端ラクトール水酸基がリグニンのアルコール性またはフェノール性水酸基と脱水縮合してエーテル状に結合したO-配糖体である。また、リグニンと糖の結合比が重量比で約1.5:1であり、特に、中性糖を多く含有する、分子量約9千のリグニン配糖体(アグリコンの特徴で分類した場合)である。

本配糖体の推定構造モデルは図面に示す通りである。

試験例1.

ポリ(ADP-リボース)グリコヒドロラーゼに対する阻害効果

アッセイ用バッファー(0.01%ウシ血清アル

表1

リグニン配糖体のポリ(ADP-リボース)グル  
コヒドロラーゼ阻害活性

リグニン配糖体濃度 ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )	ポリ(ADP-リボース) グルコヒドロラーゼ活性(%)
0	100
0.3	86
1.0	24
3.0	4

## 試験例2.

## 遺伝子発現に対する阻害効果

本試験で用いた遺伝子発現系は、糖質コルチコ  
イド感受性遺伝子である、マウス乳癌ウイルス  
(MMTV) 遺伝子を持つ、マウス乳癌細胞である3  
41株を使用した。本細胞は、糖質コルチコイ  
ド存在下において、35S RNAと、さらにスブラ  
イニングを受けた24S RNAの2種類を発現す

作用を示した。

表2

リグニン配糖体の乳癌ウイルス(MMTV) 遺伝子  
発現に対する作用

デキサメタゾン ( $10^{-6}\text{M}$ )	リグニン配糖体 ( $30\mu\text{g}/\text{ml}$ )	35S, 24S バンドの感光度
1	+	++++
2	-	+
3	-	+
4	+	++

1は陽性対照、2、3は陰性対照、4は実験群

## 試験例3.

## マウス実験腫瘍に対する増殖効果

マウスの腹腔内に、ゲルコーマ180腫瘍細胞  
を $1 \times 10^6$ 個移植し、移植後1~4日間被験物  
質を腹腔内に連続投与した。抗腫瘍活性は、生理  
食塩液投与群との比較による生存率より求めた。

ブミン-10mMメルカプトエタノール-50mMカ  
リウム・リン酸、pH7.0)に、 $^3\text{H}$ -(ADP  
-リボース) ... を加え、その27 $\mu\text{M}$ に被験  
物質およびヒト胎盤より調製した由来、ポリ  
(ADP-リボース) グリコヒドロラーゼ溶液を  
加えて全量30 $\mu\text{M}$ とした後、37 $^{\circ}\text{C}$ にて1時間  
インキュベーションした。その後、DE81濾紙に反  
応液を吸収させ、水、エタノール、アセトンで濾  
紙を洗浄した後、それを乾燥させ、液体シンチレ  
ーションカウンターにて、未反応基質 $^3\text{H}$ -(A  
DP-リボース)を測定し、本酵素に対する被験  
物質の阻害作用を検討した。その結果を示したの  
が表1であり、用いた被験物質の全てが、用量依  
存的にポリ(ADP-リボース) グリコヒドロラ  
ーゼを阻害した。

(以下空白)

る。この発現は env 部分の cDNA を用いるこ  
とにより検出することが出来る。そこで、341  
株に被験物質を30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ となる濃度に加え、37  
 $^{\circ}\text{C}$ で、30分間インキュベーションし、次に、その  
系に $10^{-6}\text{M}$ となる濃度にデキサメタゾンを添加し、  
さらに1時間インキュベーションした。その後、  
341細胞を重め、高分子RNAをグアニジン-  
塩酸法で抽出、60 $^{\circ}\text{C}$ で5分間処理(20mMPPS、  
pH7.0、5mM酢酸ナトリウム、1mMEDTA)後、  
1.2%アガロース・ゲル(同バッファー)にて、  
電気泳動(40V、16h)を行った。その後、  
ニトロセルロースへトランスファーし、 $^{32}\text{P}$ -MMTV  
-DNA (env に特異的なcDNA)をハイブリダイズし、  
X線フィルムによるオートラジオグラムを作成し  
た。その後、オートラジオグラムより35S およ  
び24S RNAのバンドの濃度をデンストメータ  
ーで測定することにより、RNA発現量を測定し、  
被験物質の無添加の場合と比較して、RNA発現  
抑制割合を算出した。その結果を示したのが表2  
であり、用いた被験物質は MMTV 遺伝子発現抑制

腫瘍移植後45日目にて実験終了とした。その結果を示したのが表3であり、用いた被験物質は制癌作用を示した。

表3

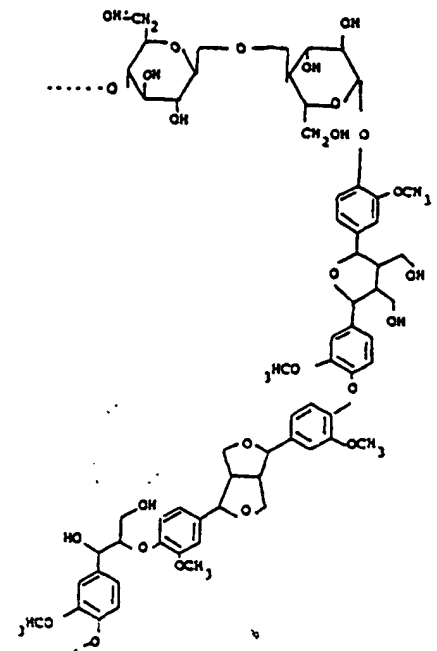
マウス腫瘍ザルコーマ180に対する  
リグニン配糖体の制癌作用

試料	Dose (mg/kg)	T/C (%)
ナシ		100
リグニン配糖体	40×4	135
	20×4	177
	10×4	157
	5×4	122

リグニン配糖体は移植日より4日間連日投与した。

図面は本発明リグニン配糖体の推定構造を示す。

特許出願人 株式会社 ミドリ十字  
代理人 弁理士 高島 一



## 手続補正書 (方式)

平成2年11月20日

特許庁長官 殿

## 1. 事件の表示

平成2年特許願第113049号

## 2. 発明の名称

リグニン配糖体およびその用途

## 3. 補正をする者

事件との関係 特許出願人

氏名(名称) 株式会社 ミドリ十字

## 4. 代理人 ⑤41

住所 大阪府中央区平野町三丁目3番9号  
(湯木ビル)

電話 (06) 227-1156

高島国際特許事務所

氏名 弁理士 (8079) 高島 一

## 5. 補正命令の日付

平成2年7月31日(発送日)

## 6. 補正の対象

明細書の「図面の簡単な説明」の欄

## 7. 補正の内容

(1)別紙の通り、明細書第19頁を差し替える。

(2)補正の対象に記載した以外は内容に変更なし。)

特許庁

腫瘍移植後45日目にて実験終了とした。その結果を示したのが表3であり、用いた被験物質は制癌作用を示した。

表3

マウス腫瘍ザルコーマ180に対する  
リグニン配糖体の制癌作用

試料	Dose (mg/kg)	T/C (%)
ナシ		100
リグニン配糖体	40×4	135
	20×4	177
	10×4	157
	5×4	122

リグニン配糖体は移植日より4日間連日投与した。

## 4. 図面の簡単な説明

図面は本発明リグニン配糖体の推定構造を示す。

特許出願人 株式会社 ミドリ十字  
代理人 弁理士 高島 一



**THIS PAGE BLANK (USPTO)**